

放射線感受性マイクロカプセルを用いた anti-CD 47 siRNA の腫瘍への標的投与と CD-47 signal (don't eat me signal) の不活化による放射線治療増強の試み

原田 聡¹、江原 茂¹、石井慶造²、世良耕一郎³、後藤祥子⁴

¹岩手医科大学医学部放射線医学講座
020-8505 岩手県盛岡市内丸 19-1

²東北大学工学研究科
980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6

³岩手医科大学サイクロトロンセンター
020-0603 岩手県滝沢市留が森 348-58

⁴日本アイソトープ協会仁科記念サイクロトロンセンター
020-0603 岩手県滝沢市留が森 348-58

1 はじめに

CD-47 signal¹は腫瘍細胞表面に発現し、macrophage や CD8+ T-cell からの貪食を避ける、いわば “don't eat me signal”として知られている¹。もし、この signal を沈静化すれば、腫瘍細胞は macrophage や CD-8+ T-cell からの貪食を受けやすくなり、癌治療における免疫療法を促進する可能性がある²。今回我々は、anti-CD-47 siRNA-プロタミン-ヒアルロン酸ナノパーティクルを放射線に反応して放出するマイクロカプセルに封入、マウス左下腿の MM48 腫瘍周囲に皮下注後、放射線を照射し、腫瘍の CD-47 signal を抑制することで、腫瘍細胞が macrophage や CD8+ T-cell により貪食されやすい様にする実験を試みた。さらに、低線量全身照射をマウスに加え、macrophage、CD8+ T-cell を活性化させ³、貪食されやすくなった腫瘍細胞を、効果的に貪食させる実験を行った。

2 材料と方法

Anti-CD 47-プロタミン-ヒアルロン酸ナノパーティクルの作成：250 nmol anti-CD47anti-SiRNA を 2ml の精製水中に溶解後、2 本のマイクロチューブに 1 mL ずつ分注、一方のマイクロチューブにプロタミン 0.1 g、もう一方のマイクロチューブにヒアルロン酸 0.1 g を溶解した。これら 2 本の溶液を、全量、静かに混和し、室温下にて 30 分間静置し、パーティクルを作成した。作成したパーティクルは 10000 rpm の遠沈下で、

3回蒸留水にて洗浄後、実験に使用された。

放射線感受性マイクロカプセルへの封入：上記パーティクル 10 億個とカルボプラチン (Pt 含有抗癌剤) 0.5 mg を、ヒアルロン酸 0.1 g とアルギン酸 0.2g を炭酸水 (アサヒ飲料社製、炭酸濃度 1512 ± 16 ppm)中に混合し、カプセル溶液とした。本混合溶液を、超音波振動を加えた CaCl_2 0.5mmol/l と FeCl_2 0.5mmol/l に噴霧し、マイクロカプセルを作成した。

動物モデルと処置：マウス乳癌腫瘍 MM48 を左下腿に移植した担癌マウス (C3He/N、6 週齢♂)を動物モデルとして使用した。同腫瘍表面に、マイクロカプセル 1 億個を皮下注射 1 時間後、140 KeV X-ray 10 あるいは 20 Gy を照射した。その 12 時間後に、4 cGy 140 KeV X-ray を 24 時間間隔にて、5 日間、マウス全身に照射した。

放射線によるマイクロカプセルからの Nanoparticle 放出：Particle Induced X-ray Emission (PIXE 法)を用いて、カプセル作成時に particle と同時に封入した、カルボプラチンの白金量を測定する事により、マイクロカプセルから particle の放出を観測した。

CD-47 signal の変化と貪食能の変化：Western blotting 法を用いて、CD-47 signal の活性化を測定した。CD-47 不活化による macrophage と CD8+ T-cell の貪食能は、それぞれ、Bioparticles®の貪食能を、Flow cytometry 法で測定することにより検出した。

抗腫瘍効果の変化：腫瘍径を毎日測定、腫瘍径の変化を観測する事により観察した。

統計計算：Analysis of Variance (ANOVA)を用い、 $P < 0.05$ を有意差ありと評価した。

3 結果

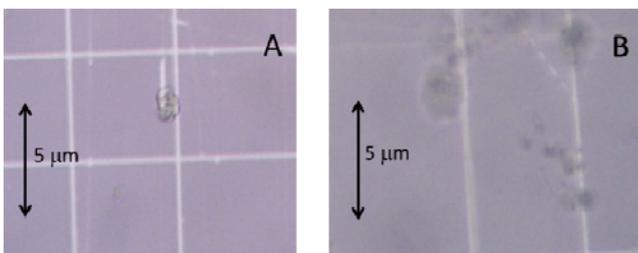


図-1：光学的顕微鏡下におけるマイクロカプセルの形態。A:放射線照射前、B: 放射線照射後 (10 Gy)。

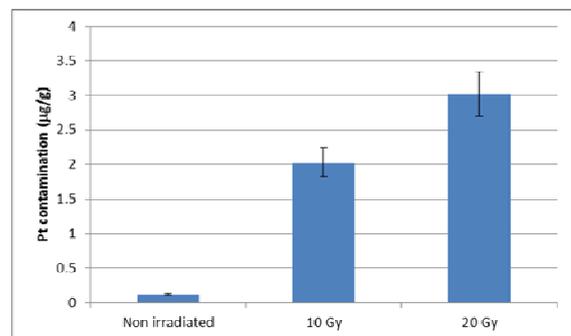


図-2：マイクロカプセルからの内容放出を観察するために混入した、カルボプラチン (白金系抗癌剤) の放出。

生成されたマイクロカプセル (図-1-A)：生成されたマイクロカプセルを、サイズ計測のため、ビルケルチュルク血球計算盤上で観察し、その平均径を求めた。カプセル径は平均 $1.8 \pm 0.1 \mu\text{m}$ であった。内部には nanoparticle による黒点が観察された。

マイクロカプセルのマウス移植腫瘍周囲への皮下注射照射：マイクロカプセル 1 億個をマウス左下腿に移植した腫瘍周囲に皮下注射した。その後、140 KeV X 線 10 または 20 Gy を照射した。照射に反応して、マイ

クロカプセルからの Particle の放出が光学顕微鏡で認められ (図-1-B)、マイクロカプセルからの内容放出を観察するために混入した、カルボプラチン (白金系抗癌剤) の放出は照射線量依存性に有意に増加した (図-2)。

放出された Anti-CD-47 siRNA nanoparticle による CD-47 signal の変化 : Western blott 法による CD-47 signal の変化を図-3 に示す。カプセルより放出された Anti-CD-47 siRNA nanoparticle により、CD-47 signal は有意に抑制された。これにより、腫瘍細胞が、macrophage や CD8+ T-cell により貪食されやすくなった。

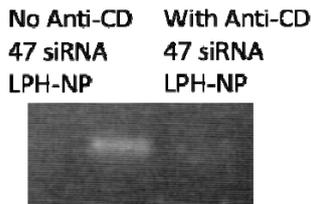


図-3 : Anti-CD 47 siRNA による CD-47 signal の鎮静化。

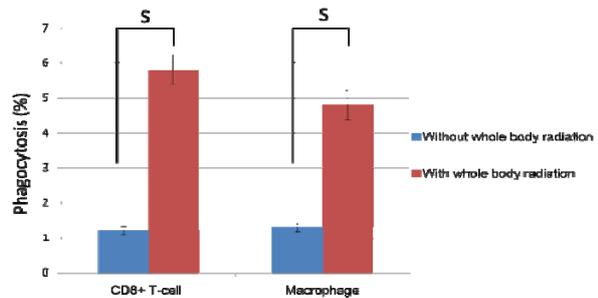


図-4 : 全身照射による CD8+ T-cell と Macrophage の貪食能更新。

小線量全身照射による macrophage, および CD-8 T-cell の活性化 : 4 cGy 140 KeV X-ray を 24 時間間隔にて、5 日間全身照射を施行した後の貪食された Bioparticle 百分率を、図-4 に示す。全身照射により、CD8+T-cell、Macrophage における Bioparticle の貪食亢進が観察された。

抗腫瘍効果 : 腫瘍径の経時的変化を図-5 に示す。10 Gy、20 Gy 照射群とも、Anti-CD-47 siRNA nanoparticle と全身照射併用群の抗腫瘍効果が、他の治療群よりも有意に強く観察された。ただし、治療 15 日より、腫瘍の再増殖が認められた。

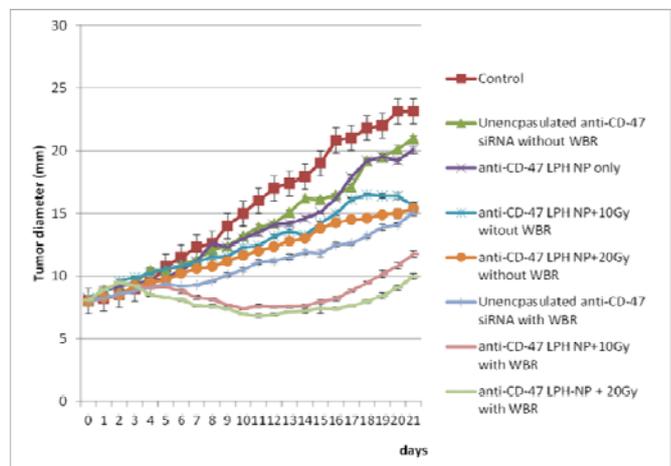


図-5 : 抗腫瘍効果

4 考察

CD-47 signal は、CD+8 T-cell や、macrophage からの貪食を免れるために、生体内の細胞に広く分布している抗原である。もし、非選択的に CD-47 signal をブロックすれば、生体内の細胞が CD+8 T-cell や、macrophage からの貪食を受けることになり、生体への死につながる。我々は、この不具合を解消し、CD-47 signal 鎮静化を腫瘍細胞にのみに作用させる目的で以下の手段を講じた。すなわち、1) CD-47 signal を鎮静化させる、Anti-CD 47 siRNA をナノパーティクルに吸着させる、2) さらに、これらナノパーティクルを、放射線に反応して内容を放出するマイクロカプセル内に封入する、3) 同マイクロカプセルを腫瘍表面の皮

下組織に注入する、4) 放射線を照射して、Anti-CD 47 siRNA を含むナノパーティクルを腫瘍表面のみに限局化する。5) 腫瘍表面に限局化されたナノパーティクルから Anti-CD 47 siRNA が徐放され、腫瘍の CD-47 のみを鎮静化する、の 5 点である。本実験では、上記 1~5 の処置により、腫瘍細胞の CD-47 signal が鎮静化されることが明らかとなった (図-3)。一方、低線量全身照射により、CD+8 T-cell や、macrophage の食食能が増強されることが示され (図-4)、これら CD-47 signal の鎮静化 (don't eat me signal の鎮静化) と CD+8-T cell と macrophage 食食能活性化が抗腫瘍効果増強につながることを示された(図-5)。しかし、再増殖が、治療後 15 日後と早期に出現してしまい、これに関しては、CD-47 signal の鎮静化と CD+8 T-cell と macrophage 食食能活性化が一過性であるという可能性もある。本問題の解決を今後の課題としたい。

Reference

1. D Kim, J Wang, SB Willingham, et. al. Anti-CD47 antibodies promote phagocytosis and inhibit the growth of human myeloma cells. *Leukemia* (2012) 26, 2538–2545.
2. Hui Wang, Jon VerHalen, Maria Lucia, et. al. Attenuation of phagocytosis of xenogeneic cells by manipulating C47. *Blood* (2007) 109. 836-842.
3. RE Roses, M Xu, GK Koski and BJ Czerniecki, Radiation therapy and Toll-like receptor signaling: implications for the treatment of cancer. *Oncogene* (2008) 27, 200–207.

Radiation sensitization, using targeted anti-CD 47 siRNA nanoparticles via radiotherapy

S. Harada¹, S. Ehara¹, K. Ishii², K. Sera³ and S. Goto⁴

¹School of Medicine, Department of Radiology, Iwate Medical University
19-1 Uchimaru, Morioka, Iwate, 020-8505 Japan.

² Department of the Quantum Science and Energy Engineering, Tohoku University
6-6-01-2 Aza Aoba, Aramaki, Sendai , Miyagi 980-8579, Japan.

³Cyclotron Research Center, Iwate Medical University
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0603, Japan

⁴Nishina Memorial Cyclotron Center, Japan Radioisotope Association
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0603, Japan

Abstract

We investigated the use of protamine-hyaluronic acid nanoparticles (PH-NP; 164 ± 2.7 nm ϕ) encapsulated in microcapsules (1.1 ± 0.3 μ m ϕ) that released their contents upon exposure to radiation together with two sessions of radiotherapy for tumor treatment.

Nanoparticles prepared via self-assembly with anti-CD47 siRNA were mixed with 1.0 ml of a solution containing 4.0% alginate, 3.0% hyaluronate, 1 mg ascorbate, and then sprayed into 0.5 mmol/l FeCl₂. MM48 murine breast cancer cells were inoculated into the left hind legs of C3He/N mice. Microcapsules were subcutaneously injected around the tumor. One hour after the injection of microcapsules, 10 or 20 Gy 140 KeV X-ray-radiation was locally administered to the tumors. Twelve hours after the completion of radiation, mice were exposed to 4cGy of whole-body ⁶⁰Co γ -radiation at 24 h intervals for 5 days.

The microcapsules released anti-CD47 siRNA nanoparticles that delivered anti-CD47 siRNA into the tumor cells. Macrophages and CD 8+ T-cells were activated by whole-body radiation. This treatment had a significant antitumor effect.

Our results indicate that targeting tumors with nanoparticles together with low-dose, whole-body radiation provides improved treatment of tumors.